

平成13年度厚生科学研究費補助金

長寿科学総合研究事業

老化による熱産生機能低下の原因解明と

予防に関する基礎的研究

(H12-長寿-012)

研 究 報 告 書

主任研究者 山下 均

平成14年3月

目次

I. 総括研究報告	
老化による熱産生機能低下の原因解明と予防に関する基礎的研究	----- 1
山下 均	
II. 分担研究報告	
1. 熱産生蛋白質欠損マウスを用いた老化過程における熱産生機能低下の メカニズムの解明	----- 8
山下 均	
2. 熱産生に対する栄養条件の影響に関する分子遺伝学的解析	----- 12
堀尾 文彦	
3. 免疫系細胞における熱産生誘導機構と細胞老化に関する研究	----- 17
西尾 康二	
4. 骨格筋におけるエネルギー代謝および熱産生と加齢変化	----- 21
佐藤 祐造	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	----- 26
IV. 研究成果の刊行物・別刷	----- 29

厚生科学研究費補助金（長寿科学総合研究事業）

総括研究報告書

老化による熱産生機能低下の原因解明と予防に関する基礎的研究

主任研究者 山下 均 国立療養所中部病院 長寿医療研究センター
分子遺伝学研究室 分子生物学研究室 室長

研究要旨 加齢に伴う熱産生機能低下の原因を明らかにするためにミトコンドリア脱共役蛋白質（UCP）分子群に注目し、2つの新しいマウスモデル系、加齢ラットおよび細胞培養系を用いて検討を行った。その結果、老化による熱産生機能の低下にUCP群の機能低下が深くかかわっていることが明らかになった。また、エネルギー消費と活性酸素制御におけるUCPの重要性が強く示唆された。UCP機能の低下は寒さ、過栄養、酸化ストレスに対する耐性低下の基盤となり、老化による耐寒性や感染防御機能の低下あるいは肥満、糖尿病などの生活習慣病の発症に関連すると考えられる。

分担研究者

堀尾文彦 助教授

名古屋大学大学院生命農学研究科

応用分子生命科学バイオモデリング講座

西尾康二 助手

名古屋大学大学院医学研究科

機能形態学講座

佐藤祐造 教授

名古屋大学総合保健体育科学センター

あるいは過剰に摂取したエネルギーの消費能力（食事誘導性熱産生）の低下により肥満を引き起こすことが明らかになっている。多くの疫学的研究は、肥満者が痩せると平均余命が延びることを示している。しかし、このように生命活動の様々な領域で作用する基本的な機能であるにもかかわらず、熱産生機能については今尚不明な点が多く残されている。

熱産生蛋白質として発見された脱共役蛋白質（UCP）は、エネルギー産生のあるミトコンドリアに存在し、糖や中性脂肪などの酸化的リン酸化により生じたプロトンをATP合成と共役することなく熱として消費する働きを有すると考えられている。また最近、ミトコンドリアの呼吸鎖で生じたプロトンは活性酸素生成の要因ともなるが、UCPは余剰のプロトンを消費することにより活性酸素生成を抑制する機能

A. 研究目的

熱産生機能は、体温の調節・維持のみならず、エネルギーの備蓄と消費、感染防御、脳内温度の調節による睡眠・覚醒の制御などと密接に係る重要な生理機能である。これらの熱産生機能の低下は、ヒトを含む加齢動物で一般的に認められる変化であり、細菌感染に対する抵抗性（免疫応答性熱産生）や耐寒性（寒冷誘導性熱産生）の低下、

を持つことが示唆されている。本研究は、UCP の働きを中心に体熱制御、エネルギー制御のメカニズムの理解、並びに加齢に伴う耐寒性や免疫機能の低下、肥満や糖尿病などの生活習慣病の発症との関連を理解することを通して老化による熱産生機能低下の原因を解明し、その予防法を開発することを目的とする。

B. 研究方法

(1) 非ふるえ熱産生において中心的役割を果たすミトコンドリア脱共役蛋白質 I 型 (UCP1) 欠損マウスを用いて、UCP1 欠損が全身のエネルギー代謝、体熱制御、寿命に与える影響とそれらの加齢や栄養条件による修飾を、生理学、薬理学、並びに分子生物学的手法を用いて検討した。

(2) 加齢と共に肥満及びインスリン非依存性糖尿病を発症するマウスとして選抜された SMxA-5 マウスを含む SMxA-リコンビナント・インブリード (SMxA-RI) マウス系統とその親株である SM/J と A/J マウスを用いて、骨格筋における UCP3 の発現レベルと糖尿病形質との遺伝学的関連を検討した。また、21 種類の SMxA-RI マウスを用いて量的遺伝子座 (QTL) 解析を実施した。

(3) UCP2 は免疫系組織において高い発現が認められることからマクロファージ系培養細胞における UCP2 の発現誘導機構と活性酸素制御における役割について細胞生物学並びに生化学的手法を用いて解析した。

(4) ふるえ熱産生やエネルギー代謝における骨格筋の役割と老化による筋萎縮 (サルコペニア) との関連から、寒冷曝露や神

経切除した老若ラットの骨格筋における UCP3、UCP2 やエネルギー代謝関連分子などの遺伝子発現の違いを分子生物学的手法を用いて検討した。

(倫理面への配慮)

動物実験に関しては、国立療養所中部病院長寿医療研究センター、または名古屋大学に設置される実験動物委員会の承認を得、動物使用の倫理規定に従って実験を行った。

C. 研究結果

(1) 前年度に引き続き UCP1 欠損マウスの表現型変化に対する加齢の影響の解析を進めた結果、UCP1 欠損マウスの雄は普通食飼育においても加齢と共に肥満傾向になること、雌マウスは高脂肪食摂取により高度の肥満となり血中レプチンレベルが上昇することが明らかになった。室温環境下における体表温度は、正常マウスでは老化による低下がみられるが、UCP1 欠損マウスでは若齢時から低いことが判明した。また、UCP1 欠損マウスの高脂肪食摂取による肥満に対してカプサイシン様作用をもつ植物アルカロイドが抑制効果を有することを見出した。

(2) 加齢により肥満・糖尿病形質を発現する SMxA-5 マウスは、高脂肪食摂取により若齢期よりインスリン分泌及び作用不全がみられた。また、これらのマウスの骨格筋において UCP3 とその転写制御にかかわる PPAR α や PGC-1 の遺伝子発現量の低下を見出した。加えて、昨年度 SMxA-RI マウス系統用いた QTL 解析により明らかにした遺伝子座をさらに絞り込み、耐糖能悪化に関連する遺伝子座を A/J アリルの 2 番, 18 番染色体と SM/J アリル

の 10 番染色体に検出した。さらに、F2 intercross を用いた genotyping は 2 番染色体の QTL の強い関与を支持した。

(3) 単球系細胞を用いた検討から、分化マクロファージの活性酸素制御能に UCP2 蛋白質の発現が重要であること、その発現制御は 4EBP1 などの翻訳調節因子や燐酸化酵素類 (70S6 kinase, MAPK など) の活性変化により調節されていることが明らかになった。また、脾臓における UCP2 蛋白質量は若齢ラットに比べて老齢ラットで低かった。

(4) 老若ラットを用いた検討から、加齢による速筋の萎縮、UCP3 蛋白質量の低下と脂質含量の増加が明らかになった。一方寒冷曝露により、若齢ラットでは遅筋の UCP3 蛋白質量は著しく低下したが、速筋の UCP3 蛋白質レベルは維持されていた。これに対して、老齢ラットでは速筋の UCP3 蛋白質レベルも低下した。座骨神経切除により誘導された萎縮筋においては、UCP3 と UCP2 の mRNA レベルの有意な上昇がみられた。

D. 考察

我々恒温動物において熱産生機能は生体のホメオスタシスを保つためばかりでなく、発熱など生体防御とも関連する極めて重要な機能である。UCP1 は冬眠動物やマウス、ラットなどの小型げっ歯類が豊富に有する褐色脂肪組織のみに発現する熱産生蛋白質である。ヒトでは褐色脂肪組織は出生直後から加齢と共に急速に消退し、成人では UCP1 の検出は非常に難しい。従って、種々の動物実験から UCP1 熱産生は寒冷環境下における体温調節だけではなく食事

誘導性熱産生にも関連することが示唆されてきたが、上記のような理由からヒトでの役割は疑問視されてきた。しかし我々の研究から、UCP1 機能の低下や不全が老化による耐寒性低下や肥満進展の基盤となることが強く示唆された。ヒトと同じように、マウスにおいても快適な住環境で適度なエネルギー摂取をしている限り UCP1 無しではほぼ正常に生きることができる。今のところ寿命にも変化はみられてない。しかし、加齢による活動量の低下に加えて高エネルギー摂取などによるエネルギーバランスの乱れが蓄積する状況下においては UCP1 機能の不全は肥満発症などの引き金となるのであろう。現在の欧米型の生活習慣を考えると、UCP1 機能を維持することが肥満や糖尿病などの生活習慣病の予防に効果があるといえる。おそらく後で述べるように、UCP1 以外の UCP 分子の発現や機能の加齢変化も関連していると思われる。一方、UCP1 機能は $\beta 3$ アドレナリンレセプター ($\beta 3AR$) を介した制御を受けることが知られている。最近の研究から、 $\beta 3AR$ の多型と肥満の関係が指摘され、多くの日本人が劣勢型の多型を有することが明らかになってきた。これらの人々では UCP1 の活性化はむしろかきと考えられ、UCP1 に依存しない熱産生機構の活性化が重要と思われる。このような視点から、我々は植物アルカロイドがもつカプサイシン様作用の体熱制御と肥満抑制に対する有効性を調べた。カプサイシンレセプターは最近クローニングされた温熱受容体の一つであり、この受容体の活性化が UCP1 欠損マウスにおいても全身のエネルギー代謝を亢進することが示唆された。現在さらに、カプサ

イシン様作用のメカニズムの解析を進めている。

筋萎縮は一般的にみられる老化現象であり、筋の神経支配の低下や低栄養が原因となり活動量の低下により助長されると考えられる。骨格筋はエネルギー代謝と熱産生において極めて重要な役割を果たすが、我々は特に熱産生における速筋の重要性を明らかにした。この骨格筋ふるえ熱産生の中心を担うのが UCP3 であり、UCP3 発現制御能の加齢による低下は、褐色脂肪組織の UCP1 機能と同様に全身の体熱制御に影響を及ぼすと考えられる。筋萎縮は糖尿病患者においても見られ、UCP3 mRNA の発現低下も報告されている。糖尿病の際、多くの組織でみられる変化は、正常高齢者で生じる変化に似ていることから、糖尿病は加速した老化と捉える考え方がある。トランスジェニックマウスを用いた検討から、UCP3 の骨格筋における過剰発現はエネルギー代謝を促進し、筋温の上昇と共に糖代謝を亢進することが最近報告された。従って、骨格筋における UCP3 の発現制御機構の解明は、糖尿病の発症や老化の進行との関連からも大変重要であると考えられる。我々は、このような視点から検討を進め、UCP3 の発現制御と糖尿病発症の関連を解き明かすための新しいモデルマウス SMxA-5 を見出し、今回さらに PPAR α などの関与を明らかにした。また、SMxA-RI マウス系統を用いた遺伝学的解析から肥満や糖尿病に関連する遺伝子座が明らかになってきた。これらの中には未だ報告されていない Locus が含まれ、今後の遺伝子の同定に興味を持たれる。

UCP のもう一つの重要な機能として活

性酸素制御における役割が明らかになってきた。特に、免疫系細胞で高発現される UCP2 の感染防御における役割は重要と考えられる。そこで我々は、マクロファージにおける UCP2 発現の制御機構を検討し、UCP2 の翻訳にかかわる分子やリン酸化酵素の重要性を明らかにしてきた。また実際に、ラット脾臓における UCP2 蛋白の発現が加齢により低下することが示唆されたことは、老化と免疫機能の低下と関連して興味深い。UCP2 のみならず、高血糖状態で増加する酸化ストレスに対して UCP1 と UCP3 が抑制的に働くという報告もある。現在、老化の原因として活性酸素説が有力であるが、酸化ストレス制御の中での UCP 分子群の役割の解明は老化の本質に迫る可能性を十分秘めていると言えるであろう。

E. 結論

老化による熱産生機能の低下に UCP 分子群の機能低下が深くかかわっている。UCP 機能の低下は、寒さ、過栄養、酸化ストレスに対する耐性低下の基盤となり、老化現象や肥満、生活習慣病の発症に関連する。老化を予防し健康を維持するために温熱制御機構の理解が不可欠と考えられる。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Mori, N., Mizuno, T., Murai, K., Nakano, I., and Yamashita, H. (2002) Effect of age on the gene expression of neural-restrictive silencing factor NRSF/REST. *Neurobiol. Aging*, 23: 255-261.
- 2) Furuyama T., Yamashita, H., Kitayama, K.,

- Higami, Y., Shimokawa, I., and Mori, N. (2002) Effects of aging and caloric restriction on the gene expression of Foxo1, 3 and 4 (FKHR, FKHL1 and AFX) in the rat skeletal muscles. *Micro. Res. Tech.*, in press.
- 3) Anunciado, R.V.P., Nishimura, M., Mori, M., Ishikawa, A., Tanaka, S., Horio, F., Ohno, T. and Namikawa, T.: Quantitative trait loci for body weight in the intercross between SM/J and A/J mice. *Exp. Anim.*, 50, 319-324 (2001)
- 4) Ohno, T., Horio, F., Kitoh, J., Tanaka, S., Nishimura, M. and Namikawa, T.: Blood and liver concentrations in EDS Shrews exhibiting spontaneous non-insulin dependent diabetes mellitus (NIDDM). *Exp. Anim.*, 50, 427-429 (2001)
- 5) Horio, F., Hayashi, K., Mishima, T., Takemori, K., Oshima, I., Makino, S., Kakinuma, A. and Ito, H.: A newly established strain of spontaneously hypertensive rat with a defect of ascorbic acid biosynthesis. *Life Sci.*, 69, 1879-1890 (2001).
- 6) Minakata, K., Nozawa, H., Watanabe-Suzuki, K., Suzuki, O., Kawai, K. and Horio, F.: A rapid and sensitive procedure for determination of copper in running water, urine and plasma by ESR. *Jpn. J. Forensic Toxicol.*, 19, 236-242 (2001)
- 7) Morimitsu, Y., Nakagawa, Y., Hayashi, H., Hujii, H., Kumagai, T., Nakamura, Y., Osawa, T., Horio, F., Itoh, K., Iida, K., Yamamoto, M. and Uchida, K.: A sulfonate analogue that potently activates the Nrf2-dependent detoxification pathway. *J. Biol. Chem.*, 277, 3456-3463 (2002)
- 8) Nishio, K., Inoue, A., Qiao, S., Kondo, H., Mimura, A. Senescence and cytoskeleton: overproduction of vimentin induces senescent-like morphology in human fibroblasts. *Histochem Cell Biol* 2001 Oct;116(4):321-7
- 9) Obayashi, M., Sato, Y., Harris, R.A., and Shimomura, Y. Regulation of the activity of branched-chain 2-oxo acid dehydrogenase (BCODH) complex by binding BCOHD kinase. *FEBS Lett.* 491: 50-54, 2001.
- 10) Nishida, Y., Higaki, Y., Tokuyama, K., Fujimi, K., Kiyonaga, A., Shindo, M., Sato, Y., and Tanaka, H. Effect of mild exercise training on glucose effectiveness in healthy men. *Diabetes Care* 24:1008-1013, 2001.
- 11) Fushimi, T., Tayama, K., Fukaya, M., Kitakoshi, K., Nakai, N., Tsukamoto, Y., and Sato, Y. Acetic acid feeding enhances glycogen repletion in liver and skeletal muscle of rats. *J. Nutr.* 131:1973-1977, 2001.
- 12) Xu, M., Nagasaki, M., Obayashi, M., Sato, Y., Tamura, T., and Shimomura, Y. Mechanism of activation of branched-chain α -keto acid dehydrogenase complex by exercise. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 287:752-756, 2001.
2. 学会発表
- 1) 山下 均, 紺谷靖英、王作成、鈴木友子、佐藤祐造、森 望：ミトコンドリア脱共役蛋白質 I 型(UCP1)欠損マウスの表現型の加齢変化。第 24 回日本基礎老化学会大会、2001 年 6 月、大阪。
- 2) 森 望、村井清人、古山達雄、山下 均：神経選択的サイレンサー結合因子 NRSF/REST 遺伝子発現の加齢応答。第 24 回日本基礎老化学会大会、2001 年 6 月、大阪。
- 3) Yamashita, H., Kotani, Y., Wang, Z.,

Furuyama, T., Sato, Y., and Mori, N. Effects of aging and denervation on the gene expression of UCPs, GLUT4 and FABP in skeletal muscles of rats. 2001 Gordon Research Conferences: Biology of Aging. Oxford. 2001年7月。

4) 紺谷靖英、山下 均、森 望：ラット視床下部における遺伝子発現の変化に対する寒冷刺激、加齢の影響。第74回日本生化学会大会，2001年10月、京都。

5) Wang, Z., Mizuno, T., Kontani, Y., Sato, Y., Mori, N., and Yamashita, H. Change of cold-induced expression of UCP2 and UCP3 in skeletal muscles during aging.第74回日本生化学会大会，2001年10月、京都。

6) 山下 均、佐藤祐造：UCP1 欠損マウスのエネルギー代謝の加齢変化と肥満。第22回日本肥満学会、2001年10月、前橋。

7) 古山達雄、山下 均、北山和子、森 望：絶食によりマウス骨格筋に誘導される遺伝子の検索。第24回日本分子生物学会大会，2001年12月、横浜。

8) 山下 均：加齢にともなう肥満の進展と熱産生蛋白質の役割。第12回日本病態生理学会シンポジウム、2002年1月、松山。

9) 小林美里、大野民生、河合隆博、辻 厚至、西村正彦、堀尾文彦：SMXA-RI（リコンビナント・インブレット）系マウスにおけるマウスにおける耐糖能と血中インスリン濃度の遺伝解析。日本農芸化学会2001年度大会（京都）。

10) 小林美里、大野民生、辻 厚至、西村正彦、堀尾文彦：SMXA リコンビナント・インブレット（RI）系統マウスを用いた糖尿病形質の QTL マッピング。第44回日

本糖尿病学会年次学術集会（京都）。

11) 堀尾文彦、小林美里、河合隆博、井尾房代、辻 厚至、大野民生、西村正彦：SMXA リコンビナント・インブレット(SMXA-RI) 系統マウスを用いた、糖尿病形質を支配する QTL(Quntitative Trait Loci)のマッピング。第18回日本疾患モデル学会総会ワークショップ「多因子疾患モデルの解析」（名古屋） 2001.11

12) 寺平 晋、仁木一郎、並河鷹夫、堀尾文彦：野生キャストネウスマウス由来の耐糖能異常マウスの近交化と、インスリン分泌を中心とした特性解析。第18回日本疾患モデル学会総会（名古屋） 2001.11

13) 寺平 晋、仁木一郎、並河鷹夫、堀尾文彦：野生キャストネウスマウス由来の耐糖能異常マウスのインスリン分泌能を中心とした特性解析。第16回日本糖尿病動物研究会（大阪）2002.2

14) 喬善楼、山下 均、西尾康二：免疫系細胞の分化と UCP の発現/分化型マクロファージ様細胞 Mm1 における UCP2 の動態と機能。第24回日本基礎老化学会大会、2001年6月、大阪。

15) 佐藤 祐造：運動療法の適応と実際。第44回日本糖尿病学会年次学術集会教育講演。京都。2001年4月。

16) 長崎 大、下村 吉治、中井 直也、徐 明、押田 芳治、佐藤 祐造。運動トレーニング経験の有無が骨格筋糖輸送能の亢進過程に及ぼす影響-過去の運動経験はトレーニング効果を高めるか?-。第44回日本糖尿病学会年次学術集会。京都。2001年4月。

17) 山之内 国男、白井 邦子、入山 愛子、岡林 直実、加藤 宏一、楠 正隆、

榊原 文彦、佐藤 祐造. 肥満耐糖能障害におけるインスリン抵抗性に対する運動トレーニング効果-グルコースクランプ法とHOMA-R による男女別比較検討-.第 44 回日本糖尿病学会年次学術集会. 京都. 2001 年 4 月。

18) T.Kajioka, K.Masaki, R.Chen, R.Abbott, K.Yano, BL Rodriguez, H.Shimokata, Y.Sato and JD Curb. The association of sagittal abdominal diameter with metabolic risk factors for cardiovascular disease in elderly Japanese-American men. The 5th International Conference on Preventive Cardiology. Osaka. 2001 年 5 月。

19) 佐藤 祐造. 「スポーツ歯科医学 21 世紀の展望」スポーツ医学の立場から. 第 12 回日本スポーツ歯科医学会学術大会特別講演. 名古屋. 2001 年 6 月。

20) T.Kajioka, R.Chen, K.Masaki, RD Abbott, K.Yano, H.Shimokata, Y.Sato, BL Rodiriquez and JD Curb. Body mass index and abdominal adiposity measures as predictors of mortality in elderly Japanese-American men. 2001 Congress of Epidemiology. Toronto. 2001 年 6 月。

21) X-C Hu, B.Quin, J.Sato and Y.Sato. Effects of gosha-jinki-gan (nin-ceh-sehn-qi-wan) chinese medicine on insulin resistance in streptozotocin-induced diabetes rats. New York 21st Century Chinese Medicine Forum. New York. 2001 年 8 月。

22) 柳本 有二、岩本 豪人、八木 莊一郎、押田 芳治、佐藤 祐造. 運動継続を目的とした健康・スポーツ教室参加者の体力及び骨強度の変化について. 第 56 回日本体力医学会大会. 仙台. 2001 年 9 月。

23) 長崎 大、下村 吉治、中井 直也、徐 明、押田 芳治、佐藤 祐造. 運動トレーニング経験が骨格筋糖輸送能の亢進過程 および 5'AMP-activated protein kinase(AMPK)に及ぼす影響. 第 56 回日本体力医学会大会. 仙台. 2001 年 9 月。

24) 柴田 優子、押田 芳治、渡辺 智之、佐藤 祐造. 運動負荷が骨代謝に及ぼす影響. 第 56 回日本体力医学会大会. 仙台. 2001 年 9 月。

25) 佐藤 祐造. レクチャーシリーズ 5 肥満の予防、治療における運動療法の意義. 第 22 回日本肥満学会.前橋. 2001 年 10 月。

26) 澤 貴広、牧田 茂、間嶋 満、佐藤 祐造. 脳卒中患者の AT レベルの運動療法によるインスリン感受性改善効果の検討. 第 12 回日本臨床スポーツ医学会学術集会. つくば. 2001 年 11 月。

27) 佐藤 祐造. ランチョンセミナー「生活習慣病の予防と運動」. 第 23 回日本健康増進学会. 淡路. 2001 年 11 月。

G. 知的所有権の取得状況

特になし

厚生科学研究費補助金（長寿科学総合研究事業）

分担研究報告書

熱産生蛋白質欠損マウスを用いた老化過程における熱産生機能低下のメカニズムの解明

主任研究者 山下 均 国立療養所中部病院長寿医療研究センター

分子遺伝学研究室 分子生物学研究室 室長

研究要旨 熱産生蛋白質であるミトコンドリア脱共役蛋白質I型（UCP1）欠損マウスの表現型の加齢変化について解析を進めた結果、正常マウスに比べてUCP1欠損マウスは加齢および高脂肪食摂取により肥満になることが明らかになった。また、室温環境下における体表温度の解析を行った結果、正常マウスは加齢と共に体表温度の低下がみられるが、UCP1欠損マウスは若齢時より体表温度が低いことが明らかになった。これはUCP1が寒冷環境下における体温調節ばかりでなく室温環境下における微妙な温度変化の調節にも関与していることを示すと同時に、加齢と高エネルギー摂取による肥満の進展のベースにUCP熱産生機能の低下が存在することを意味する。一方、UCP1機能の低下した加齢動物の耐寒性の低下や肥満進展の予防法として、カプサイシン様作用を有する植物アルカロイドをUCP1欠損マウスに投与した結果、高脂肪食摂取による体重増加が抑制された。この結果は、UCP1に依存しない体熱制御系の活性化によっても肥満を予防することができることを示唆する。

A. 研究目的

老化によるエネルギー代謝及び熱産生機能の低下は、肥満や耐寒性の低下と関連し、中高年者の健康にとって重大な問題である。熱産生蛋白質として知られるミトコンドリア脱共役蛋白質(Uncoupling protein, UCP)は、熱産生を介してエネルギーを消費し、エネルギー代謝に深く関わる。また、細胞内の活性酸素レベルの調節にも関連することが示唆されている。しかし、褐色脂肪組織のみに存在するUCP1の役割は、げっ歯類に比べてヒトでは極めて小さくUCP1に依存しない機構の重要性が示唆される。一方、最近新たにUCP1のホモ

ログとして発見されたUCP2とUCP3は、ヒト成人でも白色脂肪組織や骨格筋などで発現が認められている。本研究は、UCP1欠損(UCP1-KO)マウスを用いて老化過程における熱産生機能及びエネルギー代謝の低下のメカニズムを明らかにすると共に、UCP1欠損型肥満の予防法、治療法を開発することを目的とする。

B. 研究方法

(1) UCP1欠損(UCP1-KO)マウスの表現型の加齢変化の解析

動物個体の表現型は、その個体の遺伝的背景と環境要因により大きく影響を受ける。

特に加齢の効果を検討する場合、飼育環境の均質化とコンジェニックな実験動物の利用が重要である。我々は、コンジェニックな UCP1-KO マウス (C57BL/6J background) を作製し、本研究に使用した。Wild type マウスと UCP1-KO マウス (N12~N14) は生後 3 ヶ月間標準食で飼育した。次に各マウスを 2 群に分け、それぞれ標準食 (CE-2, 日本クレア) 又は高脂肪食 (CE-2+粉末牛脂 20%) で飼育を開始し、1 ヶ月毎に血糖量、食餌摂取量、体重の測定を行った。また、3 ヶ月毎に血液サンプルを用いてインスリン、レプチン、遊離脂肪酸、コレステロールなどを測定した。また、各群マウスの体温調節能をサーモグラフィーを用いて解析した。さらに、標準食群の耐糖能を 3, 6, 12, 18, 24 ヶ月齢で測定した。耐糖能は、15 時間絶食後 1.5 又は 2.0g/Kg 体重のグルコースを腹腔に投与し、0, 30, 60, 120 分後に血糖値を測定した。

(2) UCP1-KO マウスの肥満と熱産生に対する植物アルカロイドの効果の検討

Wild type マウスと UCP1-KO マウスを生後 4 ヶ月間標準食で飼育した後 2 群に分け、それぞれ高脂肪 (CE-2+粉末牛脂 20%) 又は高脂肪に 0.02% の植物アルカロイド (カプサイシンアゴニスト) を添加した飼料でさらに 2 ヶ月間飼育し、血液、各種脂肪組織を採取した。また、各組織より Total RNA を調製しノーザンブロット法により UCP 遺伝子発現などの検討を進めている。

(倫理面への配慮)

動物実験に関しては、国立療養所中部病院長寿医療研究センターに設置される実験動物委員会の承認を得、動物使用の倫理規定に従って実験を行った。

C. 研究結果

(1) UCP1-KO マウスは、3 ヶ月齢において雄雌共に Wild type に比べて、随時血糖、インスリン、レプチン、血清コレステロール、遊離脂肪酸、中性脂肪レベルに差はみられなかった。しかし、加齢あるいは高脂肪食の摂取により Wild type マウスと異なる表現型が顕在化してきた。すなわち、雄マウスは普通食飼育においても加齢と共に次第に肥満傾向となり、12 ヶ月齢で約 11% Wild type マウスより体重が増加した。雄 KO マウスは血中レプチンレベルが有意に低く、エネルギー摂取量が高いことが体重増加につながっていると思われる。インスリンがやや高い傾向がみられたが、脂質関連の指標に差は認められていない。一方、普通食飼育で観察された加齢変化は高脂肪食群雄では観察されず両群共に同様の肥満を呈した。

次に雌マウスにおいては、雄マウスの普通食群でみられた体重の差は両群間にみられなかったが、KO マウスは血糖レベルが有意に低く推移した。これは KO マウスの雌でインスリンレベルが加齢と共に上昇したと関連していると考えられる。驚くべきことに、KO マウスの雌は高脂肪食の摂取により加齢と共に高度の肥満となり、12 ヶ月齢で約 29% Wild type マウスより体重が増加した。肥満にもかかわらず KO マウスの血糖レベルはインスリンレベルの上昇により Wild type マウスよりも有意に低く保たれていた。また、KO マウスと Wild type マウスの間に摂食量の差はないものの、KO マウスにおいてレプチンレベルの顕著な上昇が観察された。

以前の研究から、UCP1-KO マウスは急

性寒冷曝露（23℃から5℃）に対する体温調節能力の欠如が明らかになっていた。今回我々は、室温環境下におけるより小さな温度変化（1～2℃の温度低下）に対する応答性を体表温度の変化で解析した結果、UCP1-KO マウスの体表温度が低いこと、Wild type マウスも加齢と共に体表温度が低下することが判明した。

（2）カプサイシンアゴニストとしての作用をもつ植物アルカロイドの投与により、高脂肪食摂取により誘導される体重増加と肥満度の上昇が抑制される傾向が認められた（摂食量に変化はない）。耐糖能の有意な改善はみられていない。現在、遺伝子発現などの解析を進めている。

D. 考察

UCP1-KO マウスは、若齢期においては UCP2 の代償的発現上昇により寒冷耐性の欠如を除いて Wild type マウスと同様の表現型を有すると考えられてきた。しかし今回、UCP1-KO マウスは加齢や高脂肪食摂取といったエネルギーバランスの変化にうまく適応できず肥満を呈することが明らかとなってきた。この原因の一つとして、UCP2 や UCP3 の機能が加齢と共に低下することが現在までの研究から示唆されている。我々ヒトにおいても、UCP1 は出生直後をピークとして急速に消退していくことが知られている。加齢と欧米型食生活による高エネルギーの蓄積が肥満の大きな要因であることを考えると、今回明らかになった UCP1-KO マウスの肥満はヒトにおける肥満発症パターンに極めて良く似ていると思われる。種々の肥満モデル動物が知られているが、ob/ob マウスなど

ほとんどのモデルは若齢期から高度の肥満となる。これらは、病的な肥満モデル（単遺伝子疾患）でありヒトにおける肥満の実体とは大きな隔りがある。実際の肥満は、前述したような多因子の影響を受けていると考えられ、熱産生機能の低下がそのベースにあると強く示唆される。今回新たに見つかった UCP1-KO マウスの体表温度が室温環境下においても低いことは、UCP1 が室温環境下における微妙な体温調節にも働いていることを示唆し興味深い。この熱産生機能の低下のメカニズムは未だ十分解明されてはいないが、UCP が活性酸素制御にも係ることが明らかになってきたことから、UCP 機能低下は酸化ストレスの上昇とそれに付随した蛋白質や DNA のダメージの蓄積を伴い、UCP 自身やエネルギー代謝に関連する遺伝子発現制御に影響を及ぼすと考えられ現在検討を進めている。

一方我々は、UCP1 機能低下に起因する肥満を予防する方策の検討をスタートした。すなわち、カプサイシンの熱産生作用は古くから知られていたが、カプサイシンのような辛味が無く同様な効果が期待できる植物アルカロイドの効果を調べた結果、カプサイシン様作用が UCP1 欠損型肥満に対しても効果がある基礎データを得た。カプサイシンアゴニストの薬効としては血管拡張作用による熱放散の促進が知られているが、熱放散後に生じるエネルギー代謝の亢進が消失した熱の補充とエネルギー消費を促進するものと考えられる。

E. 結論

加齢や高脂肪食摂取による肥満の進展に UCP1 熱産生機能が深くかかわっている。

一方、老化に伴う耐寒性低下や肥満進展の予防手段として、UCP1 に依存しない熱産生機能活性化の可能性が示唆された。

F. 研究発表

1. 論文発表

1) Mori, N., Mizuno, T., Murai, K., Nakano, I., and Yamashita, H. (2002) Effect of age on the gene expression of neural-restrictive silencing factor NRSF/REST. *Neurobiol. Aging*, 23: 255-261.

2) Furuyama T., Yamashita, H., Kitayama, K., Higami, Y., Shimokawa, I., and Mori, N. (2002) Effects of aging and caloric restriction on the gene expression of Foxo1, 3 and 4 (FKHR, FKHL1 and AFX) in the rat skeletal muscles. *Micro. Res. Tech.*, in press.

2. 学会発表

1) 山下 均, 紺谷靖英、王作成、鈴木友子、佐藤祐造、森 望：ミトコンドリア脱共役蛋白質 I 型(UCP1)欠損マウスの表現型の加齢変化。第 24 回日本基礎老化学会大会、2001 年 6 月、大阪。

2) 森 望、村井清人、古山達雄、山下 均：神経選択的サイレンサー結合因子 NRSF/REST 遺伝子発現の加齢応答。第 24 回日本基礎老化学会大会、2001 年 6 月、大阪。

3) Yamashita, H., Kotani, Y., Wang, Z., Furuyama, T., Sato, Y., and Mori, N. Effects of aging and denervation on the gene expression of UCPs, GLUT4 and FABP in skeletal muscles of rats. 2001 Gordon Research Conferences: Biology of Aging. Oxford. 2001 年 7 月。

4) 紺谷靖英、山下 均, 森 望：ラット視床下部における遺伝子発現の変化に対する寒冷刺激、加齢の影響。第 74 回日本生化学会大会、2001 年 10 月、京都。

5) Wang, Z., Mizuno, T., Kontani, Y., Sato, Y., Mori, N., and Yamashita, H. Change of cold-induced expression of UCP2 and UCP3 in skeletal muscles during aging. 第 74 回日本生化学会大会、2001 年 10 月、京都。

6) 山下 均, 佐藤祐造：UCP1 欠損マウスのエネルギー代謝の加齢変化と肥満。第 22 回日本肥満学会、2001 年 10 月、前橋。

7) 古山達雄、山下 均、北山和子、森 望：絶食によりマウス骨格筋に誘導される遺伝子の検索。第 24 回日本分子生物学会大会、2001 年 12 月、横浜。

8) 山下 均：加齢にともなう肥満の進展と熱産生蛋白質の役割。第 12 回日本病態生理学会シンポジウム、2002 年 1 月、松山。

G. 知的所有権の取得状況

特になし

厚生科学研究費補助金（長寿科学総合研究事業）
分担研究報告書

熱産生に対する栄養条件の影響に関する分子遺伝学的解析

分担研究者 堀尾 文彦 名古屋大学大学院生命農学研究科 助教授
応用分子生命科学バイオモデリング講座

研究要旨 (1) 新規な糖尿病モデルマウスである SMXA-5 系統は、高炭水化物食を摂取した場合には2カ月齢前後から全個体が軽度の肥満、耐糖能異常、高インスリン血症を呈する。また、高脂肪食(30%ラード含有)を摂取させると、さらに若齢期からより顕著な肥満・糖尿病症状を発症する。この系統では、インスリン作用不全(インスリン抵抗性)、インスリン分泌不全の両方が観察された。熱産生機能との関連から UCP 発現について検討したところ、骨格筋の UCP3 の発現が低く、このことは転写因子である PPAR α の骨格筋での発現が低いことに起因している可能性が示された。(2) SMXA-RI マウスの 21 系統と Strain Distribution Patterns とを用いて、糖尿病形質を支配する遺伝子座の染色体マッピングを行った。その結果、A/J アリルが耐糖能を悪化させる QTL を 2 番と 18 番染色体に、SM/J アリルが耐糖能を悪化させる QTL を 10 番染色体に検出した。これらのことより、正常な形質を示す A/J および SM/J 系統も糖尿病遺伝子を有しており、それらの組み合わせで糖尿病は発症することが示された。(3) 高脂肪食摂取によって糖尿病を発症しやすい SMXA-5 系統と、発症しにくい SM/J 系統とを交配して、F2 intercross 312 匹を得た。これらの F2 マウスに高脂肪食を与えて、耐糖能、血糖値、血中インスリン濃度、UCP 発現などを測定した。これらの形質値と、各 F2 マウスの genotyping の結果を用いて QTL 解析を行ったところ、2 番染色体に耐糖能を強力に支配する QTL が検出された。これは前項で見出された 2 番染色体の QTL に一致するものと考えられた。

A. 研究目的

SMXA-RI 系統は、SM/J と A/J より作出されたりコンピナント・インブレッド(RI) 系統であり、日本で唯一存在する RI 系統群である。現在は 26 系統が維持されている。各系統は近交系統であり、各系統の広範な染色体部位について、それらが SM/J 由来であるのか、A/J 由来であるの

かが詳細に調べられており、そのパネルは Strain Distribution Patterns (SDP) と呼ばれる。この充実した SDP の存在こそが、SMXA-RI 系統群の遺伝学的価値を高めている。各系統の表現形質(phenotype)の測定値(例えば、血糖値や血中インスリン濃度)と SDP とを用いて、量的遺伝子座解析(Quantitative Trait Loci 解析: QTL 解

析)法によってある形質を支配する単一あるいは複数の遺伝子座を決定することが可能である。そこで本研究では、この SMXA-RI 系統 21 系統を用いて、種々の血液パラメーターに加えて脱共役タンパク質 (UCP) の発現制御を指標とし、肥満や糖尿病の新規原因遺伝子を同定することを目的とした。

B. 研究方法

(1) 新規な肥満・糖尿病モデルマウスとしての SMXA-5 系統の熱産生に着目した特性解析

5 週齢の雄の SMXA-5 に、高炭水化物食を与える群と高脂肪食 (30% ラード含有) を与える群とをもうけて、20 週齢時にマウスを屠殺して解析した。対照系統として、SM/J および A/J 系統を用い、同様の飼料群をもうけた。骨格筋、白色脂肪組織、褐色脂肪組織における脱共役タンパク質 (uncoupling protein: UCP) 1、2、3、および核内受容体 PPAR α 、転写因子コアクチベーターである PGC-1 の mRNA レベルを解析した。

(2) SMXA-RI マウス 21 系統を用いた糖尿病原因遺伝子座の染色体マッピング

6 週齢の雄の SM/J, A/J および SMXA-RI 系統 (SMXA-4, 5, 8, 9, 10, 12, 14, 15, 16, 17, 18, 24, 26, 30) のマウスを各系統 10 匹用いた。繁殖が悪い系統 (SMXA-1, 7, 19, 21, 25, 27, 29) については、それ以下の匹数とした。カゼイン 12%、コーン油 5% を含む準精製飼料を 10 週間自由摂取させた。5 週目と 10 週目に、耐糖能試験、血糖値、血中インスリン濃度および肥満度の測定を行った。耐糖能試験は、

午後 8 時頃からマウスを絶食させ、13~14 時間後にグルコース (2 g/kg 体重) を腹腔内注射し、30 分、60 分、120 分後に血糖値を測定した。5 週目および 10 週目に得られた各測定値と、SDP とを用いて MapManager QT により QTL 解析を行った。

(3) 高脂肪食摂取下における糖尿病原因遺伝子の QTL 解析

高脂肪食摂取によって糖尿病を誘発しやすい系統である SMXA-5 系統の雄と、発症しにくい系統である SM/J 系統の雌とを交配して F1 マウスを得た。この F1 マウス同士を交配して、F2 マウスの雄を 312 匹作出した。この F2 マウスに 6 週齢から高脂肪食 (30% ラード、20% カゼイン含有) を与えて、前実験と同様の糖尿病形質の解析を行った。各個体についてゲノム DNA を調整して、約 50 種類のマイクロサテライトマーカーを用いて、全ゲノムタイピング (genotyping) を進めている。さらに、形質値と genotyping との結果を用いて QTL 解析を進める。

(倫理面への配慮)

動物実験は、名古屋大学実験動物委員会の承認を得、動物利用倫理規定に従って実施した。

C. 研究結果

(1) 新規な肥満・糖尿病モデルマウスとしての SMXA-5 系統の熱産生に着目した特性解析

SMXA-5 系統は、高炭水化物食を摂取した場合には 2 カ月齢前後から全個体が軽度の肥満、耐糖能異常、高インスリン血症を呈する。また、高脂肪食を摂取させると、

さらに若齢期からより顕著な肥満・糖尿病症状を発症する。この系統では、インスリン作用不全（インスリン抵抗性）、インスリン分泌不全の両方が観察された。さらに、骨格筋の転写因子である PPAR α 、転写因子コアクチベーターである PGC-1 の mRNA レベルを検討したところ、SM/J に比べて SMXA-5 ではこれらの mRNA レベルが明らかに低レベルであった。このことが SMXA-5 の骨格筋での UCP3 の発現を低くしている可能性が推定される。

(2) SMXA-RI マウス 21 系統を用いた糖尿病原因遺伝子座の染色体マッピング

耐糖能試験においては、120分値が糖尿病の判定に重要視される。120分値が 200 mg/dl 以上の個体は糖尿病（耐糖能異常）と判断されるが、SMXA-RI 系統の中には明らかな耐糖能異常を示すものが 6 系統も存在した。血中インスリン濃度も、親系統よりも低いものから高いものまで、広く分布していた。本結果より、SMXA-RI 系統の中には数系統の糖尿病系統が存在していることが明らかとなった。中でも、SMXA-5 系統は耐糖能異常の程度も強く、高インスリン血症が観察されることより、2 型糖尿病のモデル系統と考えられた。親系統である SM/J および A/J 系統は、非糖尿病系統であることも明らかとなった。

耐糖能試験の各時点での血糖値（0, 30, 60, 120 分値）、非絶食時血糖値、血中インスリン濃度と SDP を用いて MapManager QT で QTL 解析を行った。その結果、Significant level あるいは Suggestive level の QTL が多数同定された。2 番、18 番染色体の QTL は A/J アリルが、10 番染色体の QTL は SM/J ア

リルが耐糖能を悪化させた。18 番染色体領域は、2 型糖尿病モデル系統である NZO マウスの血糖値の QTL の近傍であった。また、2 番染色体領域も 2 型糖尿病モデルである TSOD マウスの血中インスリン値の QTL の近傍であった。

(3) 高脂肪食摂取下における糖尿病原因遺伝子の QTL 解析

SMXA-5、SM/J 両系統の 6 週齢の雄に、高脂肪食（30%ラード含有）を 10 週間与えて、糖尿病形質の解析を行った。その結果、前実験での結果と比べて、高脂肪食の摂取によって SMXA-5 系統の耐糖能は著明に悪化し、血中インスリン濃度も高くなることが明らかとなった。一方、SM/J 系統の耐糖能および血中インスリン濃度には高脂肪食摂取によって大きな変化は見られなかった。両系統のマウスを交配して F2 インタークロスマウスを 312 匹作成して、耐糖能、血中インスリン濃度、血糖値を測定した。現在、F2 マウス 312 匹の約 50 箇所の染色体領域について各個体の genotyping を行っており、この結果を用いて各形質の QTL 解析を完了する予定である。現在まで進めた結果において、2 番染色体に耐糖能を強力に支配する（LOD score: 10.0 以上）QTL を検出しており、これは前項で検出した 2 番染色体の locus と同一のものと考えている。

D. 考察

(1) UCP は数種の subtype の発見とともに、様々な動物種において共通したエネルギー代謝の鍵タンパク質としての生理的意義が注目されている。本結果より、SMXA-5 は UCP3 のエネルギー代謝調節

における役割を探る貴重なモデル動物だと考えられた。

(2) SMXA-RI 系統群は単一のみならず多数の遺伝子によって支配される形質の遺伝解析に好適な系統群であることが示された。そして、耐糖能および血糖値を支配する locus を少なくとも3つ検出した。その内、2つは既報に示された糖尿病遺伝子座の近傍にあり、1つはおそらく報告されていない locus であると推定している。また、本結果の重要な意義として、正常な形質を示す SM/J と A/J も糖尿病遺伝子を有しており、それらの組み合わせで糖尿病が発症することが示された点である。

(3) SMXA-5 と SM/J を用いた交配系の結果より、高脂肪食摂取下での糖尿病遺伝子座がマッピングできた。栄養条件を視野に入れた実質的な糖尿病遺伝子の同定が可能になったと考えている。

E. 結論

SMXA-5 系統マウスは、若齢期から軽度の肥満、著明な耐糖能異常を発症する新規の2型糖尿病モデルであることが示された。このモデルは、骨格筋の UCP3 の発現レベルが低く、UCP3 の肥満および糖尿病への関与を探究する格好のモデルと考えられた。また、SMXA-RI 2 1 系統を用いて、糖尿病原因遺伝子の染色体マッピングに成功し、複数の locus が検出された。その中でも2番染色体の locus は、高炭水化物食を摂取した時にも、高脂肪食を摂取した時にも強力に耐糖能と血糖値を支配しており、今後の研究によりその同定を目指す。

F. 研究発表

1. 論文発表

1) Anunciado, R.V.P., Nishimura, M., Mori, M., Ishikawa, A., Tanaka, S., Horio, F., Ohno, T. and Namikawa, T.: Quantitative trait loci for body weight in the intercross between SM/J and A/J mice. *Exp. Anim.*, 50, 319-324 (2001)

2) Ohno, T., Horio, F., Kitoh, J., Tanaka, S., Nishimura, M. and Namikawa, T.: Blood and liver concentrations in EDS Shrews exhibiting spontaneous non-insulin dependent diabetes mellitus (NIDDM). *Exp. Anim.*, 50, 427-429 (2001)

3) Horio, F., Hayashi, K., Mishima, T., Takemori, K., Oshima, I., Makino, S., Kakinuma, A. and Ito, H.: A newly established strain of spontaneously hypertensive rat with a defect of ascorbic acid biosynthesis. *Life Sci.*, 69, 1879-1890 (2001).

4) Minakata, K., Nozawa, H., Watanabe-Suzuki, K., Suzuki, O., Kawai, K. and Horio, F.: A rapid and sensitive procedure for determination of copper in running water, urine and plasma by ESR. *Jpn. J. Forensic Toxicol.*, 19, 236-242 (2001)

5) Morimitsu, Y., Nakagawa, Y., Hayashi, H., Hujii, H., Kumagai, T., Nakamura, Y., Osawa, T., Horio, F., Itoh, K., Iida, K., Yamamoto, M. and Uchida, K.: A sulfonate analogue that potently activates the Nrf2-dependent detoxification pathway. *J. Biol. Chem.*, 277, 3456-3463 (2002)

2. 学会発表

1) 小林美里、大野民生、河合隆博、辻 厚至、西村正彦、堀尾文彦：SMXA-RI (リ

コンビナント・インブレット)系マウスにおけるマウスにおける耐糖能と血中インスリン濃度の遺伝解析。日本農芸化学会 2001 年度大会 (京都)。

2) 小林美里、大野民生、辻 厚至、西村正彦、堀尾文彦: SMXA リコンビナント・インブレット (RI) 系統マウスを用いた糖尿病形質の QTL マッピング。第 44 回日本糖尿病学会年次学術集会 (京都)。

3) 堀尾文彦、小林美里、河合隆博、井尾房代、辻 厚至、大野民生、西村正彦: SMXA リコンビナント・インブレット (SMXA-RI) 系統マウスを用いた、糖尿病形質を支配する QTL (Quantitative Trait Loci) のマッピング。第 18 回日本疾患モデル学会総会ワークショップ「多因子疾患モデルの解析」(名古屋) 2001.11

4) 寺平 晋、仁木一郎、並河鷹夫、堀尾文彦: 野生キャストネウスマウス由来の耐糖能異常マウスの近交化と、インスリン分泌を中心とした特性解析。第 18 回日本疾患モデル学会総会 (名古屋) 2001.11

5) 寺平 晋、仁木一郎、並河鷹夫、堀尾文彦: 野生キャストネウスマウス由来の耐糖能異常マウスのインスリン分泌能を中心とした特性解析。第 16 回日本糖尿病動物研究会 (大阪) 2002.2

6) 小林美里、井尾房代、河合隆博、辻 厚至、大野民生、西村正彦、堀尾文彦: SMXA-5 系統マウスの糖尿病形質の特性の解析。第 16 回日本糖尿病動物研究会 (大阪) 2002.2

G. 知的所有権の取得状況

特になし

厚生科学研究費補助金（長寿科学総合研究事業）
分担研究報告書

免疫系細胞における熱産生誘導機構と細胞老化に関する研究

分担研究者 西尾 康二 名古屋大学大学院医学研究科 助手
機能形態学講座

研究要旨 アンカッパー蛋白質(UCP)はミトコンドリア内膜における熱産生機能の中心的役割を演じている。また最近、UCP2 は活性酸素に対する抗酸化システムとしても機能することが示唆されている。我々は、未分化のマウス白血病細胞 M1 と分化型マクロファージ Mm1 細胞を用いて、マクロファージ細胞分化および UCP2 レベルとミトコンドリア機能について研究を行ってきた。その結果、分化した Mm1 細胞において UCP2 蛋白レベルは顕著に高く、Mm1 のミトコンドリア酸化機能も亢進していた。種々の翻訳調節因子、及びそれらのリン酸化酵素類の活性変化について解析したところ、Mm1 細胞のリン酸化翻訳開始因子 p-eIF2, eIF4E 結合蛋白 4EBP1 のリン酸化シグナルは M1 細胞よりも顕著であった。これらの結果は、UCP2 蛋白レベルの調節が転写後の翻訳制御によることを強く示唆する。また老若ラットの脾臓における UCP2 蛋白量の解析から、老齢ラットの UCP2 蛋白の発現は若齢ラットより有意に低いことが明らかとなった。免疫系細胞における UCP2 蛋白レベルの低下は活性酸素耐性の低下と関連し、個体老化のスピードを速める可能性がある。

A. 研究目的

マクロファージ分化に伴う UCP2 蛋白レベルの増加のメカニズムを明らかにするため、翻訳調節因子の関与を調べた。各因子のリン酸化レベルを分化型マクロファージ Mm1 及び未分化細胞 M1 を用いて解析した。近年、活性酸素の過剰発現により老化が進行する：老化の活性酸素説が有力である。UCP2 は活性酸素産生を抑制する機能を有することが明らかになってきた。そこで老化固体の UCP2 mRNA 及び UCP2 蛋白レベルの変化を解析し、UCP2 蛋白レベルの変化と老化との関連を検討した。加えて、これまで UCP2 の組織分布につい

て体系的に解析された報告がないので、今回 UCP2 蛋白の組織分布についても解析を行った。

B. 研究方法

1. M1 及び Mm1 細胞の翻訳調節因子の活性の検討

M1 及び Mm1 細胞の総蛋白、それぞれ 50 μ g をアクリルアミドゲル電気泳動で分離し、ニトロセルロース膜に転写した。ニトロセルロース膜は、3%アルブミンによってブロッキング後、一次抗体：抗 p-70S6(Thr389) kinase, p-44/42 MAPK (Thr202/thr204), p-AKT(Ser423), p-

eIF2, 4EBP1(Thr70), 4EBP1(Ser65)等と4℃で一晩反応させた。0.05%の Tween 20-PBS で3回洗浄後、ペルオキシダーゼ結合抗ラビット IgG (Sigma 社、1:1000希釈)と室温で1時間反応、洗浄後 ECL 法にて検出した。

2. Western blot 法により老若ラット脾臓 UCP2 蛋白レベルの比較

6ヶ月齢と24ヶ月齢のラット4匹ずつを使用し、脾臓よりミトコンドリア蛋白質を抽出し、Western blot 法で UCP2 蛋白発現量を比較検討した。

3. Tissue Array を用いて老若ラット各臓器 UCP2 レベルの比較

①免疫蛍光染色法: SuperBioChips Laboratories 社から老若ラット各臓器を含む Tissue Array を購入し、脱パラフィンの後、2% H₂O₂ 加メタノールにて内因性ペルオキシダーゼの阻止を行い、PBS による洗浄の後、アルブミンにより非特異的反応をブロックし、一次抗体として抗ラビット UCP2 抗体を用い、4℃にて一晩インキュベーションを行った。切片は、PBS 洗浄の後、FITC 標識抗マウス IgG ヤギ抗体 (1:167希釈)と室温で1時間反応させた。また、陰性コントロールとして一次抗体の代わりに、PBS を用いて同様に染色を行った。十分洗浄後、共焦点レーザー顕微鏡で観察し撮影した。

② FISH (Fluorescence in situ hybridization) 法: 同じ SuperBioChips Laboratories 社から老若ラット各臓器を含むホルマリン固定パラフィン Tissue Array を用い、脱パラフィン後、合成した double FITC UCP2 プローブを用い (Targetregion: Bases 406-435 of the total UCP2 sequence from Yoshitomi et al., 1998), ハイブリダイゼーションした。またコントロール double FITC プロ

ーブ (5'GCT GAC TAC GACCAGACA AAG TAC CAT TTG3') を用いて同様に染色した。十分洗浄後、共焦点レーザー顕微鏡で観察し撮影した。

(倫理面への配慮)

動物実験は、国立療養所中部病院長寿医療研究センター実験動物委員会の承認を得、動物使用の倫理規定に従って行った。

C. 研究結果

翻訳開始因子の解析により、注目すべき特徴として、抗 p-70S6(Thr389) kinase, p-44/42 MAPK (Thr202/thr204), p-AKT(Ser423)のシグナルは未分化 M1 細胞の方が顕著に高く、一方分化型 Mm1 細胞の p-eIF2, 4EBP1(Thr70), 4EBP1(Ser65)のシグナルは M1 細胞よりも顕著に強かった。

Western blot の結果では老齢ラット脾臓の UCP2 蛋白発現は若齢ラットより有意に低かった。UCP2 蛋白の組織局在性に関しては、胃粘膜、小脳分子層において強陽性であった。また肺、脾臓、肝臓、小腸の各臓器に存在するマクロファージが陽性であった。若齢ラットの UCP2 蛋白の免疫蛍光強度が老齢ラットより強いことが明らかであった。FISH による解析の結果、胃粘膜及び小腸において UCP2 mRNA の強陽性細胞が認められた。また肺及び肝臓のマクロファージ、小脳のプルキンエ細胞などが陽性と認められた。老若ラット間では、若齢ラットのシグナルが老齢ラットより強かった。

D. 考察

1. マクロファージが種々の刺激(LPS, interferon-gamma)を受け、NO (nitro oxide), nitrite, nitrate, nitrosoamine 等の ROS (reactive oxygen species)を産生